

GENE-RECOMBINANT TCF EXHIBITING HIGH BIOACTIVITY OWING TO SPECIFIED SUGAR CHAIN STRUCTURE

Patent Number: JP6116299
Publication date: 1994-04-26
Inventor(s): TSUDA HIDEYORI; others: 03
Applicant(s):: SNOW BRAND MILK PROD CO LTD
Requested Patent: ☐ JP6116299
Application Number: JP19920289456 19921002
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14 ; C12N15/16 ; C12P21/00
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To provide a gene-recombinant TCF exhibiting a growth promoting action on the hepatocyte and useful for treating hepatic diseases.

CONSTITUTION: A TCF having a sugar chain structure and specified by the following properties; (1) Molecular weight (SDS electrolysis method) 78000+ or -2000 dalton in nonreduction state, 52000+ or -2000 dalton (alpha chain), 30000+ or -2000 dalton (beta chain) and 26000+ or -2000 dalton (beta' chain) in reduction state. (2) Neutral saccharides, aminosaccharides and acid saccharides are contained and most of the acid saccharides are N-acetylneuraminic acid. (3) To most of the N- bonded saccharides, one or more cyanuric acids are bonded. (4) Most of asialo N-bonded sugar chains are double stranded composite N-bonded saccharides to which a fucose is bonded.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-116299

(43) 公開日 平成6年(1994)4月26日

(51) IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/14		8517-4H		
C 1 2 N 15/16				
C 1 2 P 21/00		H 8214-4B		
// A 6 1 K 37/24	A C S	8314-4C		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数2(全10頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-289456

(22) 出願日 平成4年(1992)10月2日

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 津田 英資

栃木県下都賀郡石橋町石橋662 マロニエ
ハイツ201

(72) 発明者 後藤 雅昭

栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1

(72) 発明者 上田 正次

埼玉県川越市今福1672-1 メゾンむさし
野719

(72) 発明者 東尾 侃二

埼玉県川越市山田1769-10

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 特定の糖鎖構造により高い生物活性を有する遺伝子組換え型TCF

(57) 【要約】

【構成】 次の特性で特定される、糖鎖構造を有するTCF

①分子量 (SDS電気泳動法) 非還元下 78000±2000ダルトン

還元下 52000±2000ダルトン (α鎖)

30000±2000ダルトン (β鎖)

26000±2000ダルトン (β'鎖)

②中性糖、アミノ糖、酸性糖を含み、酸性糖のほとんどがN-アセチルノイラミン酸である。

③N-結合糖鎖の大部分に1個または2個のシアル酸が結合している。

④アシアロN-結合糖鎖の多くは、フコースが結合した2本鎖型の複合型N-結合糖鎖である。

【効果】 肝実質細胞に対する増殖活性を有し、肝臓疾患の治療に有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の特性により特定される糖鎖構造を有する遺伝子組換え型TCF (rTCF)

①SDS電気泳動による分子量測定では非還元下 78000±2000ダルトンの分子量を示し、還元した場合 52000±2000ダルトンのバンドであるα鎖と 30000±2000ダルトンのバンドであるβ鎖及び 26000±2000ダルトンのバンドであるβ'鎖とを示す。

②中性糖及びアミノ糖として、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース、フコース、ガラクトースが含有されている。

③酸性糖としてTCF 1モル当たり約 3.5~6.5 モルのシアル酸が含有されており、そのほとんどがN-アセチルノイラミン酸である。

④N-結合糖鎖の約50%以上にシアル酸が1個、20%以上にシアル酸が2個、5%以上にシアル酸が3個結合している。

⑤N-結合糖鎖の約40%以上がフコースが結合した2本鎖型の複合型糖鎖であり、さらに約5%がバイセクトグルコサミン構造を有するフコースが結合した2本鎖型の複合型糖鎖である。

【請求項2】 ヒトTCF遺伝子を組み込んだベクターにより形質転換されたナマルワ(Namalwa)細胞を培養して得られた請求項1記載の糖鎖構造を有するrTCF。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は特定の糖鎖構造により高い生物活性を有する遺伝子組換え型糖蛋白質TCF (rTCF)に関する。本発明により得られる糖鎖構造を持つrTCFは肝臓実質細胞に対する増殖活性を有し、肝臓疾患の治療剤として有用である。

【0002】

【従来の技術】ヒト細胞由来の線維芽細胞が生産する腫瘍細胞増殖因子としてβインターフェロンが広く知られている。また線維芽細胞が生産する物質としては特開昭58-146293号公報、特開昭61-33120号、特開昭61-1872号公報、62-103021号公報、特開昭64-10998号公報にそれぞれ開示されている。本発明者らはヒト線維芽細胞由来の抗腫瘍性蛋白質を研究する過程において、これまで報告されたこれらの蛋白質と全く異なる新規な抗腫瘍性物質を発見し、さらにこの蛋白質をコードするcDNAのクローニングに成功し、その全アミノ酸配列を確定するとともに、有用性を確認した。この新規な抗腫瘍性蛋白質とその遺伝子はWO90/10651として開示されている。この新規抗腫瘍性蛋白質はTCF-IIと命名されている。本発明においては上記WO90/10651に開示されたアミノ酸配列を有する糖蛋白質をTCFと称する。このTCFは強い抗腫瘍活性と正常細胞の増殖活性を合わせもち、さらに肝臓実質細胞の増殖因子であるH

2

GFの多様なファミリーの一種であることが確認された。TCFはSDS電気泳動による分子量測定では 78000±2000ダルトンの分子量を示し、還元した場合 52000±2000ダルトンのバンドであるα鎖と 30000±2000ダルトンのバンドであるβ鎖及び 26000±2000ダルトンのバンドであるβ'鎖とを示す。このβ鎖にはN-結合糖鎖が2個、β'鎖にはN-結合糖鎖が1個結合している。

【0003】TCFは肝臓実質細胞の増殖因子であることから肝切除後の肝臓再生を目的とした利用が検討されている。しかしその活性と糖蛋白質の糖鎖構造の関係は知られていなかった。真核細胞を用いた遺伝子組換え蛋白質の生産では糖鎖が結合することがあるが、この糖鎖の構造は細胞単独で決定するものではなく、遺伝子の種類により異なることが知られている。またヒトエリスロポエチンなど一部の糖蛋白質では、同じ蛋白質をコードする遺伝子あるいは生産細胞であっても得られた糖蛋白質の糖鎖構造には微妙な差があり、生物活性が異なることなどが知られている(Goto M. et al., Bio/TECHNOLOGY, Vol. 6, 67-71, 1988)。糖鎖構造と生理活性の関係については殆ど判明していないのが現状である。肝臓増殖因子の一つであるHGFをコードする遺伝子をハムスター由来のCHO細胞で発現させ得られたHGFの糖鎖構造が中村らにより発表されている(中村他, 日本農芸化学会誌, 66巻 3号, 302頁, 1992年)。しかし糖鎖構造と肝臓実質細胞の増殖活性の関係は明らかにされていない。本発明はrTCFの肝臓実質細胞増殖効果と糖鎖構造の関係を初めて明らかにしたものである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らはTCFの有用性に注目し、抗腫瘍剤としての利用や疾病の診断のマーカーとしての利用を検討してきた。しかし、TCFの糖鎖構造と活性の関係は確認されていない。本発明者らは、rTCFの肝臓実質細胞に対する作用を研究する過程から、rTCFがその活性を発現する場合には、糖鎖構造が重要な役割を果たすことを初めて見いだした。本発明は、これまで報告されている肝細胞増殖因子と異なる糖鎖構造を有し、肝細胞増殖因子として有用なrTCFを提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明による糖鎖構造を有するrTCFは下記の物理化学的特性を有している。

①電気泳動による分子量測定では 78000±2000ダルトンの分子量を示し、還元した場合 52000±2000ダルトンのバンドであるα鎖と 30000±2000ダルトンのバンドであるβ鎖及び 26000±2000ダルトンのバンドであるβ'鎖とを示す。

②中性糖、アミノ糖としてN-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース、フコース、ガラクトースを含有する。

③酸性糖としてrTCF 1モル当たり約 3.5~6.5 モル

3

のシアル酸が含有されており、そのほとんどがN-アセチルノイラミン酸である。

④N-結合糖鎖の約50%以上にシアル酸が1個、20%以上にシアル酸が2個、5%以上にシアル酸が3個結合している。

⑤N-結合糖鎖の約40%以上がフコースが結合した2本鎖型の複合型糖鎖であり、さらに約5%がバイセクトグルコサミン構造を有するフコースが結合した2本鎖型の複合型糖鎖である。

【0006】このような糖鎖構造を有するTCFあるいはrTCFまたはHGFあるいはrHGFはこれまで知られていないものである。特に本発明の糖鎖構造を有するrTCFは生物活性がアシアロ型rTCFと比較して高いことが特徴である。遺伝子組換え型エリスロポエチンのin vitroでの生物活性はアシアロ型が未処理のエリスロポエチンと比較して高いが(Tsuda E. et al., Eur. J. Biochem., Vol. 188, 405-411, 1990)、TCFでは逆の相関が観察された。このような糖鎖構造と生物活性についての相関はこれまで知られていなかった新しい知見である。

【0007】本発明に係る糖鎖構造を有するrTCFを得る方法は以下の手段による。TCFは先に示したWO90/10651にその全アミノ酸配列及びコードするDNA配列が開示されている。さらに同公報に記載された遺伝子配列に基づいて、本発明の糖鎖構造を有するrTCFを生産するためには、同じく、WO92/01053号として公開されている方法で生産する。WO92/01053号に記載されたナマルワ細胞(Namalwa)により生産することにより、本発明の糖鎖構造を有する生物活性の高いrTCFを生産することができる。

【0008】TCFは通常の単離精製法によってさらに濃縮・精製することができる。例えば、塩析、ゲル濾過クロマト、モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマト、電気泳動法などが上げられる。これらの精製法の内モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトについては、本発明者により特願平3-177236号として出願されているモノクローナル抗体を用いて精製することができる。得られた精製TCFは、凍結乾燥若しくは凍結保存することができる。

【0009】以下に実施例を示しさらに本発明を詳細に説明する。

【実施例1】

生物活性の発現に寄与する糖鎖構造を有するTCFの製造

WO92/01053公報に開示された方法に準じて行った。TCF大量発現プラスミドpCDTCFdh(上記WO92/01053に開示されている)10μgとpMCIneo(フナコシ社製)を10μlのTEバッファー(10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.5)に溶解し、これに1.5mlのOPTI-MEM(ギブコ社製)を加えたDNAを調製した。これをリポフェク

4

ン法(Focus, 11, (2), 37(1989))によりヒトナマルワ細胞(ATCC CRL 1432)に導入し、常法により形質転換体を選別し、rTCF生産細胞株を得た。このTCF遺伝子を組み込んだ細胞を培養し、精製rTCFを得た。形質転換ナマルワ(Namalwa)細胞を培養し、培養液20lを得た。この培養液をCM-セファデックスC-50クロマト、MonoS カラムを装着したHPLC、ヘパリン5PW カラムを装着したHPLCの順に処理を行い、約11mgのrTCFを得た。なお、この生産に用いた細胞株は微生物工業研究所菌条第3480号(FERM BP-3480)として寄託されている。

【0010】

【実施例2】

rTCFの糖鎖構造の分析例

本実施例においては、実施例1で得られた糖鎖構造を有するrTCFの糖鎖構造解析例を示す。

【方法】

1. 単糖組成分析

1-1. アミノ糖と中性糖の定量

20 Namalwa 細胞で発現させ精製した遺伝子組換え型TCF(以下、rTCF)1nmoleを2M トリフルオロ酢酸を加えた2M 塩酸100μlに溶解させ、減圧下100℃で6時間加熱した。室温にまで冷却した後、内部標準としてリボース20nmoleを加え濃縮乾固した。ビリジン/メタノール/水(30:15:10)溶液55μlと無水酢酸2μlを加え試料を溶解し、室温で30分間放置した後、濃縮乾固した。この試料につき、糖質PA化装置PALSTATION Model 4000(宝酒造株式会社製)と単糖分析用試薬キット(宝酒造株式会社製)を用い、単糖の2-アミノビリジン標識を行った。即ち、分析用試料にカップリング試薬10μlを添加し90℃で10分間反応させた後、窒素気流下60℃にて濃縮乾固した。残渣に還元試薬10μlを添加し、90℃で35分間反応させた。この反応液にメタノール20μlを添加して良く攪拌した後、トルエン40μlを添加し、攪拌後窒素気流下50℃にて10分間濃縮乾固した。この濃縮乾固操作を繰り返した後、トルエン50μlを添加し良く攪拌し、窒素気流下50℃にて10分間濃縮乾固した。N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、マンノース、ガラクトース、フコース各20nmoleを含む試料についても上記の操作を行い、2-アミノビリジン標識標準品とした。これらの分析用試料を200μlの水に溶解させ、試料の5μlをTSKgel Sugar AXIカラム(0.46 x 15cm; 東ソー株式会社製)で分析した。カラムクロマトグラフィーによる分析条件を以下に記載する。

移動相; 0.7M カリウムほう酸緩衝液(pH9.0):アセトニトリル=9:1

流速; 0.3ml/min

カラム温度; 65℃

50 検出器; 蛍光光度計 Ex. 310nm, Em. 380nm

【0011】1-2. シアル酸の定量

r T C F 25 μ g を 4 mM 塩化カルシウムを加えた 60 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 20 μ l に溶解させ、2U/ml のシアリダーゼ (*Streptococcus* sp. 由来; 生化学工業株式会社製) 5 μ l を加え、37℃ で 3 時間反応させた。この反応液につき、過沃素酸-チオバルピツール酸法で遊離シアル酸を定量した。即ち、9M リン酸を加えた 0.1M 過沃素酸ナトリウム溶液 25 μ l を加え、室温で 20 分間放置した。0.5M 硫酸ナトリウムと 0.05M 硫酸を加えた 0.77M 亜硫酸ナトリウム溶液 125 μ l を加え良く攪拌した後、0.5M 硫酸ナトリウムを加えたチオバルピツール酸溶液 375 μ l を加え、良く攪拌し、100℃ で 10 分間加熱した。反応液を室温に冷却した後シクロヘキサノン 625 μ l を加え良く攪拌し、赤色の反応物を抽出した。シクロヘキサノン層の 549nm の吸収を測定した。0~2 μ g の N-アセチルノイラミン酸 (生化学工業株式会社製) につき試験検体と同様に過沃素酸-チオバルピツール酸法による処理を行い、検量線を作成した。

【0012】1-3. シアル酸分子種の決定

r T C F 250 μ g を 2M 酢酸溶液 100 μ l に溶解させ、80℃ で 3 時間加熱しシアル酸を遊離させた。この溶液を室温に冷却し、1.4M 酢酸、0.75M 2-メルカプトエタノール、18mM ハイドロサルファイトナトリウム溶液に溶解させた 7mM DMB (1,2-diamino-4,5-methylene-dioxybenzene) 溶液 100 μ l を加え、50℃ で 2 時間 30 分間加熱し、遊離シアル酸を DMB 標識した。この試料を氷水中で冷却し、反応を停止させた。N-アセチルノイラミン酸 (生化学工業株式会社製) と N-グリコリルノイラミン酸 (シグマ社製) 100 μ g につき同様に DMB 標識を行った。これらの DMB 標識試料につき、ODS-80 TM カラム (0.46 x 25cm; 東ソー株式会社製) を用いた高速液体クロマトグラフィーで分析を行った。分析条件を以下に記載する。

移動相; アセトニトリル:メタノール:水 = 9:7:84 (v/v)

流速; 1ml/min

カラム温度; 室温

検出器; 蛍光光度計 Ex. 373nm, Em. 418nm

【0013】2. N-結合糖鎖構造解析

2-1. 2-アミノピリジン標識したシアロN-結合糖鎖の調製

r T C F 5mg を糖蛋白質糖鎖調製システム、ヒドラクラブ S-204 (ホーネン株式会社製) とヒドラジン分解試薬 (ホーネン株式会社製) を用いてヒドラジン分解し、シアロN-結合糖鎖を遊離させた。即ち、凍結乾燥した r T C F 5mg を真空ポンプ吸引下 50℃ でさらに乾燥させた。真空ポンプで減圧状態にした後、ヒドラジン試薬を注入し、110℃ で 1 時間反応させた。反応終了後、真空ポンプで吸引し、ヒドラジンを除去した。ヒドラジン分解した試料につき、アセチル化試薬 (ホーネン株式会社

製) を用い N-アセチル化を行った。即ち、ヒドラジン分解した試料に酢酸アンモニウム試薬 (ホーネン株式会社製) 2.5ml を加え良く攪拌した後、無水酢酸試薬 (ホーネン株式会社製) 250 μ l を加え良く攪拌し、室温で 30 分間放置した。この操作を繰り返した後、試料を凍結乾燥した。ヒドラジン分解し N-アセチル化した試料を 2-アミノピリジンで蛍光標識した。即ち、凍結乾燥した試料を密封蓋付チューブに移し、2-アミノピリジン試薬 (2-アミノピリジン 1g を濃塩酸 0.65ml に溶解) 0.4ml を加え良く攪拌した後、90℃ で 10 分間加熱した。試料を室温にまで冷却した後、シアノ水素化ほう素ナトリウム溶液 (80mg のシアノ水素化ほう素ナトリウムを 48 μ l の水に溶解) 40 μ l を加え 90℃ で 1 時間加熱した。この試料を Toyopearl HW-40F (東ソー株式会社製) カラム (1.6x40cm) を担体として用い、10mM 重炭酸アンモニウム溶液を移動相として用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより、2-アミノピリジン標識したシアロN-結合糖鎖を精製した。

【0014】2-2. シアロN-結合糖鎖のシアル酸結合数の解析

精製した 2-アミノピリジン標識シアロN-結合糖鎖を TSKgel DEAE-5PW カラム (0.75 x 7.5cm; 東ソー株式会社製) で分析した。分析条件を以下に記載する。

移動相; 移動相 A (水), 移動相 B (0.1M 塩化ナトリウム水溶液)

グラジエント; 移動相 A 100% から移動相 B 100% までの 60 分間の直線的勾配

流速; 0.6 ml/min

カラム温度; 室温

検出器; 蛍光光度計 Ex. 320nm, Em. 400nm

ヒト α ; -酸性糖蛋白質から 2-1. 項で記載した方法に従って 2-アミノピリジン標識シアロN-結合糖鎖を調製した。この試料を標準品として r T C F のシアロN-結合糖鎖のシアル酸結合数を決定した。

【0015】2-3. アシアロN-結合糖鎖の構造解析

2-アミノピリジン標識したシアロN-結合糖鎖標品を 4 mM 塩化カルシウムを加えた 60 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 20 μ l に溶解させ、2U/ml のシアリダーゼ (*Streptococcus* sp. 由来; 生化学工業株式会社製) 5 μ l を加え、37℃ で 3 時間反応させアシアロN-結合糖鎖標品を調製した。この標品を Shimpack CLC-ODS カラム (0.46x15cm; 島津製作所製) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィーにかけ、主要な 10 種類のアシアロN-結合糖鎖を精製分取した。クロマトグラフィーの条件を以下に記載する。

移動相 A; 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.8)

移動相 B; 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.8), 0.5% n-ブタノール

移動相 A, B の濃度勾配

時間 (min) B (%)

7

0 18
20 18
40 28
140 58

流速; 1 ml/min

カラム温度; 55℃

検出器; 蛍光光度計 Ex. 320nm, Em. 400nm

【0016】精製分取したアシアロN-結合糖鎖標品につき以下に記載する条件でβ-ガラクトシダーゼ消化あるいはα-フコシダーゼ消化を行った。

β-ガラクトシダーゼ消化条件

試験検体を0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH 4.1)に溶解させ、β-ガラクトシダーゼ(タチナタマメ由来; 生化学工業株式会社製)を2U/mlの濃度に加え、37℃で一晩反応させた。100℃で10分間加熱した後、12,000rpmで10分間遠心し、その上清を分析用試験検体とした。

【0017】α-フコシダーゼ消化条件

試験検体を0.1Mクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に溶解させ、α-フコシダーゼ(ウシ腎臓由来; ペーリンガーマンハイム山之内株式会社製)を5U/mlの濃度に加え、37℃で2時間反応させた。100℃で10分間加熱した後、12,000rpmで10分間遠心し、その上清を分析用試験検体とした。

【0018】精製分取した各アシアロN-結合糖鎖及びエキソグリコシダーゼ消化した各アシアロN-結合糖鎖標品につき、Shimpack CLC-ODSカラムと Amido-80 カラム(0.46×25cm; 東ソー株式会社製)を用いた分析を行った。Shimpack CLC-ODSカラムを用いた分析条件は既に記載した条件に同じ。Amido-80カラムを用いた分析条件*30

8

*を以下に記載する。移動相 A; 3% 酢酸トリエチルアミン緩衝液(pH 7.3): アセトニトリル=35:65 移動相 B; 3% 酢酸トリエチルアミン緩衝液(pH 7.3): アセトニトリル=50:50 グラジエント; 移動相 A 100% から移動相 B 100%までの50分間の直線的勾配流速; 1ml/min

カラム温度; 45℃

検出器; 蛍光光度計 Ex. 320nm, Em. 400nm

各糖鎖の溶出時間を2-アミノピリジン標識したグルコースオリゴマー標準品(ホーネン株式会社製)の溶出時間と比較し、その溶出時間をグルコースオリゴマー単位に換算した。グルコースオリゴマー単位に換算した各糖鎖の溶出位置をアシアロN-結合糖鎖標準品の溶出位置と比較して糖鎖構造を決定した。

【0019】〔結果〕

1. 単糖組成分析

1-1. アミノ糖と中性糖の定量

トリフルオロ酢酸と塩酸による加水分解により r T C F から単糖を遊離させ、遊離した単糖を 2-アミノピリジンで蛍光ラベルした。この分析用試料を TSKgel Sugar AXI カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析しアミノ糖と中性糖を定量した。分析結果を表1に示す。

【0020】この分析結果から r T C F の糖鎖は主に複合型N-結合糖鎖であることが示唆された。またその複合型N-結合糖鎖は2本鎖型程度の糖鎖であることが推測された。少量のN-アセチルガラクトサミンが検出されたことから、O-結合糖鎖が存在する可能性も示された。

【0021】

〔表1〕

r T C F のアミノ糖と中性糖含量

	mole/mole
N-Acetyl Galactosamine	0.6
N-Acetyl Glucosamine	14.7
Mannose	11.2
Fucose	2.7
Galactose	7.7

【0022】1-2. シアル酸の定量

シアリダーゼ消化で r T C F からシアル酸を遊離させ、遊離シアル酸を過沃素酸-チオバルビツール酸法で定量した。r T C F のシアル酸含量は 5.2 mole/mole であった。

【0023】1-3. シアル酸分子種の決定

酸加水分解法で r T C F からシアル酸を遊離させ、遊離シアル酸を DMB (1,2-diamino-4,5-methylene-dioxybenzene) で蛍光ラベルした。DMB ラベルしたシアル酸を ODS-80 TM カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー

で分析した。クロマトグラムを図1に示す。r T C F のシアル酸はN-アセチルノイラミン酸であることが確認された。また痕跡程度のN-グリコリルノイラミン酸も検出された。

【0024】2. N-結合糖鎖構造解析

2-1. シアロN-結合糖鎖のシアル酸結合数の解析

ヒドラジン分解法で遊離させ2-アミノピリジンで蛍光ラベルした r T C F のシアロN-結合糖鎖を、TSKgel D EAE-5PW カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析した。クロマトグラムを図2に示した。各シアロ糖

鎖ピークのシアル酸結合数はヒト α_1 -酸性糖蛋白質から調製したシアロN-結合糖鎖を標準として用い決定した。TSKgel DEAE-5PW カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析したrTCFのN-結合糖鎖のシアル*

*酸結合数を表2に示す。

[0025]

[表2]

rTCFのN-結合糖鎖のシアル酸結合数

	%
Mono-sialo	63
Di-sialo	27
Tri-sialo	9
Tetra-sialo	1

[0026] 2-2. アシアロN-結合糖鎖の構造解析
2-アミノピリジン標識したシアロN-結合糖鎖標品をシアリダーゼ消化し、アシアロN-結合糖鎖標品を調製した。この試料を Shimpack CLC-ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、アシアロN-結合糖鎖を精製分取した。クロマトグラムを図3に示した。クロマトグラムに a~j の記号を付した糖鎖を分取し、方法 2-3. 項に記載した方法でその構造を解析した。アシアロN-結合糖鎖 a~j の含量と決定した構造を図4に示した。rTCFのN-結合糖鎖の約20%を占める糖鎖 a~f については、完全な構造決定は行っていない。

[0027] rTCFのアシアロN-結合糖鎖は、フコースが結合した2本鎖型の複合型N-結合糖鎖が全糖鎖の約50%を占めていることで特徴づけられる。またjに示した所謂バイセクトグルコサミン構造を持つフコース結合2本鎖型の複合型N-結合糖鎖が約5%存在することもその特徴である。この様な糖鎖構造を持つTCFやHGFは全くの新規物質と考えられる。特にjの構造を持つ糖鎖は、ヒトIgGに存在することが報告されている。rTCFの生産に用いた Namalwa細胞はパーキッリンパ腫患者由来の細胞株であり、通常のB細胞表面抗原はほとんど発現している細胞である。したがって、Namalwa細胞で発現したrTCFにもB細胞由来のプラズマ細胞で生産されるIgGと類似した糖鎖が発現しているものと考えられる。

[0028]

[実施例3]

アシアロrTCFの in vitro 生物活性の検討

本実施例においては、実施例1で得られた新規糖鎖構造を有するTCFの生物活性が糖鎖構造の変化により影響を受けることを確認した例を示す。

[方法]

アシアロrTCFの in vitro 生物活性の検討

1. アシアロrTCFの調製法

rTCFをシアリダーゼ処理しアシアロrTCFを調製した。即ち、0.5mgのrTCFを10mM塩化カルシウムを加えた0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 400 μ l に溶解させ、

2U/mlのシアリダーゼ(Streptococcus sp.由来; 生化学工業株式会社製)100 μ lを加え、37℃で3時間反応させた。この試料に、2%牛血清アルブミンと0.01% Tween 20を加えた燐酸塩緩衝生理食塩水(pH7.2)500 μ lを加えた後、滅菌フィルター(Milllex CV; 日本ミリポアリミテッド製)で濾過滅菌した。濾過した試料 700 μ lに1%牛血清アルブミンと0.01% Tween 20を加えた燐酸塩緩衝生理食塩水(pH7.2)2.8mlを加え良く攪拌した後、滅菌したチューブに小分けして-80℃で凍結保存した。シアリダーゼを加えずに同様の処理を行ったrTCFをコントロール検体として調製した。

[0029] 2. シアリダーゼ処理によるシアル酸除去の確認

試験に供したrTCFからのシアル酸の除去はシアリダーゼ処理により遊離したシアル酸量と酸加水分解法で遊離したシアル酸量を比較することにより行った。すなわち50 μ gのrTCFを10mM塩化カルシウムを加えた0.1M酢酸ナトリウム緩衝液40 μ lに溶解させ、2U/mlのシアリダーゼ(Streptococcus sp.由来; 生化学工業株式会社製)10 μ lを加え、37℃で3時間反応させた。また50 μ gのrTCFを密封蓋付チューブに入れ、0.1N硫酸溶液50 μ lに溶解させ80℃で1時間加水分解した。これらの試料につき、1-2.項に記載した過沃素酸-チオバルビツール酸法で遊離シアル酸の定量を行った。過沃素酸-チオバルビツール酸法に用いた各試薬量は1-2.項に記載した量の2倍量を用いた。

40 [0030] 3. in vitro 生物活性測定法

成熟ラット肝実質細胞を常法に従って調製した(Gchda E. et al., Exp. Cell Res., Vol. 166, 139-150, 1986)。即ち、体重約200gのウイスター系成熟ラット肝をコラーゲナーゼ(和光純薬製)で灌流して得られた細胞を5℃の冷却下、50 x gで1分間5回遠心洗浄することにより肝実質細胞を調製した。得られた細胞を、10mMデキサメサゾンと10%牛胎仔血清を加えたウィリアムズE培地(GIBCO社製)(以下、活性測定用培地)に懸濁させ、96穴マルチウェルに播種した(10⁴個/0.1 ml/ウェル)。5% CO₂濃度に調整したCO₂インキュベーター中で

20時間培養した後、0~80ng/mlのrTCF検体を加え、更に24時間培養した。細胞増殖アッセイキット(アマシヤム・ジャパン株式会社製)のプロトコールを一部改変してデオキシブロモウリジンの取り込みを測定した。即ち、各ウェルに活性測定用培地で10倍希釈したラベリング試薬20 μ lを加え、CO₂インキュベーター中で更に24時間培養した。培養後、各ウェルを磷酸塩緩衝生理食塩水(pH7.2)で洗浄し、固定液(酢酸:エタノール:水=5:90:5)200 μ lを加え30分間細胞固定を行った。各ウェルを0.1% Tween 20を加えた磷酸塩緩衝生理食塩水(pH7.2)で3回洗浄した後、3%牛血清アルブミンと0.1% Tween 20を加えた磷酸塩緩衝生理食塩水(pH7.2)100 μ lを加え15分間放置した。この液を除いた後、ヌクレアーゼ/抗5'-プロモ-2'-デオキシウリジン抗体溶液50 μ lを各ウェルに加え、1時間放置した。各ウェルを0.1% Tween 20を加えた磷酸塩緩衝生理食塩水(pH7.2)で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼラベルした抗マウスIgG抗体溶液50 μ lを加え、30分間放置した。各ウェルを0.1% Tween 20を加えた磷酸塩*

シアリダーゼ処理によるrTCFからの遊離シアル酸の定量

	遊離シアル酸 μ g/mg TCF
シアリダーゼ処理	17.8 \pm 0.5
硫酸加水分解	16.0 \pm 0.3

【0033】2. アシアロrTCFのin vitro生物活性の検討

成熟ラット肝実質細胞を標的細胞として用い、細胞へのDNAの取り込みを指標として、アシアロrTCFと未処理のrTCFのin vitro生物活性を比較した。用量依存性曲線を図5に示した。アシアロrTCFのin vitro生物活性は未処理のrTCFと比較して約50%に活性が低下した。この結果から、rTCFのin vitro生物活性発現において、適切な構造の糖鎖の付加が重要であることが示された。

【0034】

【発明の効果】本発明により、特定の糖鎖構造により高い生物活性を有するrTCFが提供される。本発明による糖鎖構造を有するrTCFは肝実質細胞の増殖効果がアシアロ体と比較して高い値を示す。

*緩衝生理食塩水(pH7.2)で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質溶液100 μ lを加え30分間反応させた。0.01%アジ化ナトリウムを加えた2.1%クエン酸溶液50 μ lを加え、反応を停止させた後、ELISA用プレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。

【0031】【結果】

1. シアリダーゼ処理によるシアル酸除去の確認

In vitro生物活性の検討に用いた条件でシアリダーゼ処理したrTCFと酸加水分解法でシアル酸を遊離させたrTCFからの遊離シアル酸を測定した。結果を表3に示した。表3に示されるように、両分析法によるシアル酸の分析値はほぼ同じ数値を示し、シアリダーゼ処理によりrTCFから完全にシアル酸が除去されていることが示された。硫酸加水分解により遊離させたシアル酸の定量値がやや低いのは、加水分解操作により、一部のシアル酸が分解されているためであると考えられる。

【0032】

【表3】

【図面の簡単な説明】

【図1】rTCFから遊離させたシアル酸を蛍光ラベルした物質のHPLCパターンを示す。

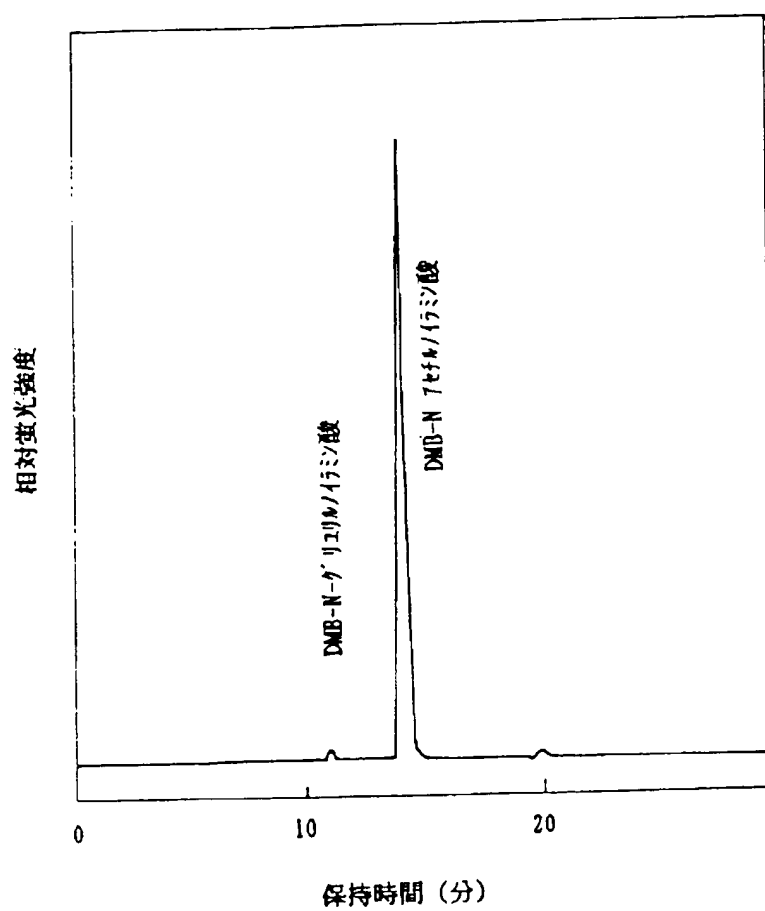
【図2】ヒドラジン分解法によりrTCFより遊離させ2-アミノピリジン標識したシアロN-結合糖鎖のHPLCパターンを示す。

【図3】2-アミノピリジン標識したシアロN-結合糖鎖をシアリダーゼ消化して得た、アシアロN-結合糖鎖のHPLCパターンを示す。

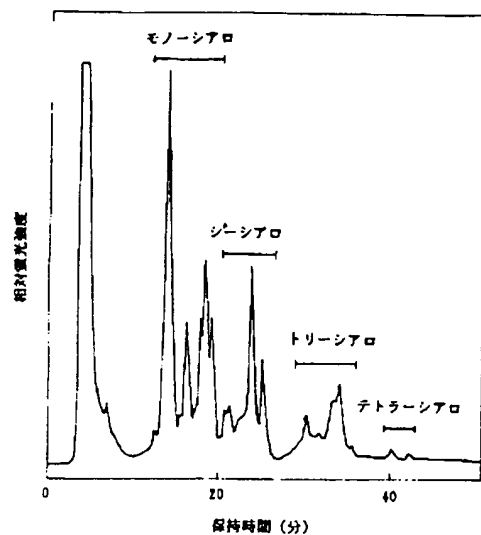
【図4】HPLCにより分取したアシアロN-結合糖鎖の構造とrTCF中での構成比を示す。

【図5】アシアロ型糖鎖を有するrTCFと本発明糖鎖構造を有するrTCFの成熟ラット肝実質細胞へのDNAの取り込みを指標とした容量依存曲線を示す。

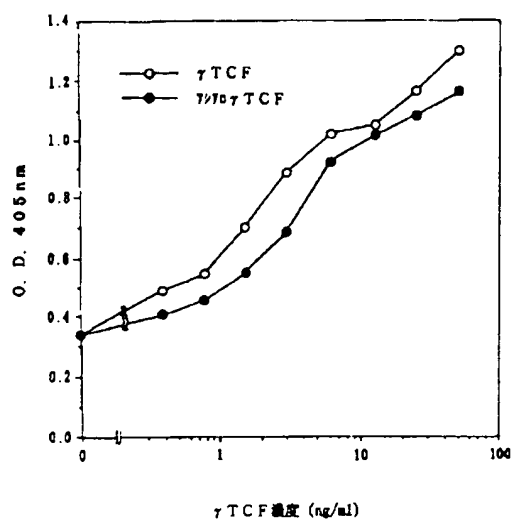
【図1】



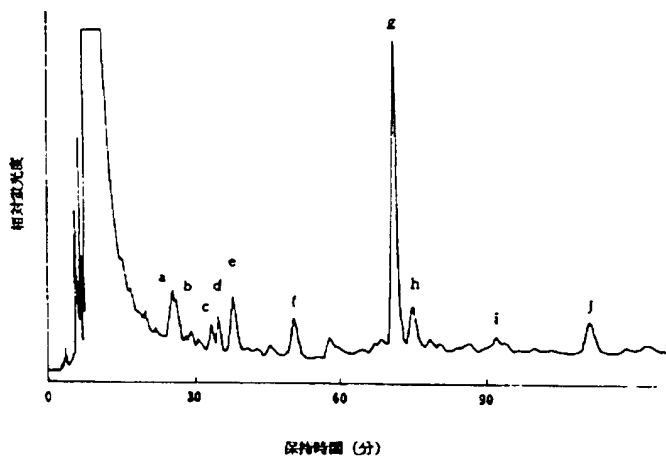
【図2】



【図5】



【図3】



【図4】

a	-----	0%
b	-----	4%
c	-----	3%
d	-----	3%
e	-----	9%

f	$ \begin{array}{l} G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 6) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) - M(\alpha 1 \rightarrow 3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ M(\alpha 1 \rightarrow 3) \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \\ \\ M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} F(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ F(\alpha 1 \rightarrow 6) \end{array} $	8%
---	--	----

g	$ \begin{array}{l} G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2)M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2)M(\alpha 1 \rightarrow 3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ M(\alpha 1 \rightarrow 3) \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \\ M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} F(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ F(\alpha 1 \rightarrow 6) \end{array} $	48%
---	--	-----

h	$ \begin{array}{l} G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 6) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ \\ M(\alpha 1 \rightarrow 3) \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \\ \\ \\ M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} F(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ \\ F(\alpha 1 \rightarrow 6) \end{array} $	11%
---	--	-----

i	$ \begin{array}{l} G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) - M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ M(\alpha 1 \rightarrow 3) \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \\ \\ M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} F(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ F(\alpha 1 \rightarrow 6) \end{array} $	3%
---	--	----

j	$ \begin{array}{l} G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) - M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ GN(\beta 1 \rightarrow 4) - M(\alpha 1 \rightarrow 3) \\ G(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 2) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} M(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ M(\alpha 1 \rightarrow 3) \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \\ \\ M(\beta 1 \rightarrow 4)GN(\beta 1 \rightarrow 4)GN \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} F(\alpha 1 \rightarrow 6) \\ \\ F(\alpha 1 \rightarrow 6) \end{array} $	5%
---	---	----

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:91)